



⑮ **BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND**



**DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT**

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 100 53 506 A 1**

⑤① Int. Cl. 7:
A 61 K 38/17

⑮

⑦① Aktenzeichen: 100 53 506.2
⑦② Anmeldetag: 27. 10. 2000
④③ Offenlegungstag: 2. 5. 2002

DE 100 53 506 A 1

⑦① **Anmelder:**
Max-Delbrück-Centrum für molekulare Medizin,
13125 Berlin, DE

⑦④ **Vertreter:**
Baumbach, F., Dipl.-Chem. Dr.rer.nat., Pat.-Anw.,
13125 Berlin

⑦② **Erfinder:**
Willnow, Thomas, Dr., 13465 Berlin, DE

BEST AVAILABLE COPY

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

⑤④ **Mittel zur Prävention von Organschäden, die durch Aminoglykoside induziert werden**

⑤⑦ Die Erfindung betrifft Mittel zur Prävention von Organschäden, insbesondere der Niere und des Innenohres, die durch Aminoglykosid-Gabe induziert werden. Erfindungsgemäße Mittel sind sämtliche Substanzen, die Megalin Antagonisten (Inhibitoren) darstellen. Insbesondere handelt es sich um Moleküle (Verbindungen), die polybasische Strukturen aufweisen, welche an Megalin binden und die Bindung von Aminoglykosiden und verwandten Stoffen hemmen. Bevorzugte Verbindungen im Sinne der Erfindung sind insbesondere struktur- oder funktionsverwandte Moleküle des polybasischen Polymyxins.

DE 100 53 506 A 1

[0001] Die Erfindung betrifft Mittel zur Prävention vor Organschäden, insbesondere der Niere und des Innenohres, die durch Aminoglykosid-Gabe induziert werden. Mit Hilfe der erfinderischen Lösung werden verschiedene Funktionen, die als Nebenwirkungen bei einer Antibiotika-Behandlung mit Antibiotika aus der Gruppe der Aminoglykoside auftreten, gehemmt. Erfindungsgemäße Mittel sind sämtliche Substanzen, die Megalin Antagonisten (Inhibitoren) darstellen. Insbesondere handelt es sich um Moleküle (Verbindungen), die polybasische Strukturen aufweisen, welche an Megalin binden und die Bindung von Aminoglykosiden und verwandten Stoffen hemmen. Bevorzugte Verbindungen im Sinne der Erfindung sind struktur- oder funktionsverwandte Moleküle des polybasischen Polymyxins. In einer anderen Ausführungsvariante handelt es sich um Peptide/Proteine, die bevorzugt vom natürlich vorkommenden RAP (receptor-associated protein) abgeleitet sind und die die gleichen Eigenschaften besitzen. Insbesondere sind es minimale funktionelle Proteindomänen. Maximal weisen diese Peptide 104 Aminosäuren auf, vorzugsweise 20 bis 60 Aminosäuren.

[0002] Bekanntermaßen gehören Aminoglykoside zu den wichtigsten Antibiotika zur Behandlung schwerer bakterieller Infektionen. Für eine Reihe gramnegativer Erreger sind sie die Mittel der Wahl. Ihr Markt beläuft sich in Deutschland auf etwa 500 Millionen DM pro Jahr. Der Marktanteil der Aminoglykoside im Segment der Antiinfektiva steigt derzeit sogar noch deutlich an. Dies ist vor allem auf die steigende Zahl von Tuberkulose-Erkrankungen und sowie die generelle Zunahme der Resistenzen gegen andere Antibiotika-Klassen zurückzuführen.

[0003] Das größte Hindernis für den klinischen Einsatz der Aminoglykoside liegt in ihren schweren oto- und nephrotoxischen Nebenwirkungen, welche langfristig insbesondere zu vollständigem Hörverlust und zu Nierenversagen führen. Der Einsatz der Aminoglykoside ist somit nicht nur mit einem großen Risiko behaftet, sondern verursacht auch hohe Folgekosten. Ihre Anwendung bleibt daher in Industrienationen auf Fälle schwerster Infektionen beschränkt. In Entwicklungsländern, in denen Aminoglykoside auf Grund ihrer geringen Herstellungskosten wesentlich häufiger eingesetzt werden, sind diese Antibiotika für 30% aller Fälle von Taubheit verantwortlich.

[0004] Über die Ursachen ihrer Toxizität war bisher nur bekannt, dass Aminoglykoside an die Oberfläche von Zellen der Niere und des Innenohres binden und über unbekannte Mechanismen in die Zellen aufgenommen werden. Da Aminoglykoside in den Zellen nur schwer abbaubar sind, häufen sie sich in großen Mengen an und führen zur Zerstörung der Zellstrukturen und damit zu Nierenschäden und Hörverlust. Verschiedenste Oberflächenstrukturen oder Rezeptoren wurden für die Bindung und Aufnahme der Antibiotika verantwortlich gemacht; ein klarer Nachweis der Bindungsstellen für Aminoglykoside auf den Körperzellen gelang bisher jedoch nicht. Decorti und Mitarbeiter postulierten, dass die Aufnahme von Aminoglykosiden ein rezeptorunabhängiger Diffusionsprozeß sei (Decorti et al., Life Sciences 65, 1115-1124). Moestrup und Kollegen dagegen vertraten die Auffassung, dass Megalin, ein Oberflächenrezeptor der Niere, für die Antibiotika-Aufnahme verantwortlich ist (Moestrup et al. J. Clin. Invest. 96, 1404-1413, 1995). Allerdings konnte von Moestrup et al. nur die Bindung von Aminoglykosiden an Megalin im Reagenzglas und in kultivierten Zellen nachgewiesen werden. Im Tiermodell dagegen führte die Anwendung von Rezeptorantagonisten zu keiner signifikanten Inhibition der Aminoglykosid-Auf-

nahme in die Niere. Außerdem binden die Aminoglykoside auch an andere Oberflächenrezeptoren (sogenannte LRP's), welche in der Leber, nicht aber in der Niere zu finden sind. Da Aminoglykoside im Organismus aber ausschließlich in der Niere und im Innenohr aufgenommen werden, war eine Aussagekraft dieser in vitro Experimente unklar.

[0005] Bisher wurden verschiedene Strategien realisiert, um die toxischen Effekte der Aminoglykoside zu vermindern. Ursprünglich traten bei etwa 40% aller Patienten nephro- und ototoxische Nebenwirkungen auf. Da diese direkt mit den Plasmaspiegeln der Antibiotika korrelierten, wurden begleitende Plasmaspiegelbestimmungen zur Kontrolle der Antibiotika-Konzentrationen eingeführt. Außerdem zeigte sich, daß die Gabe in 12- bzw. 24-Stunden-Intervallen mit einer geringeren Nebenwirkungsrate einhergeht als Dosierschemata mit häufigerer Verabreichung. Durch solche Maßnahmen ließ sich die Zahl der von Nebenwirkungen betroffenen Patienten auf 10% reduzieren (Burton, M.E., Vasko, M.R. & Brater, D.C. Clin. Pharmacokinetics 10, 1-37 (1985)). Sie führten allerdings zu einem deutlichen Anstieg der Behandlungskosten. Diese beinhalten die Laborleistungen für Plasmaspiegelbestimmungen (DM 200-600 bei einer Behandlungsdauer von 10 Tagen), den zusätzlichen Aufwand für medizinisches Personal und Aufwendungen von etwa DM 800 pro Patient zur Diagnostik und Therapie von Nierenschäden.

[0006] Als zweite Strategie zur Vermeidung toxischer Effekte wurden neue Aminoglykoside entwickelt, welche geringere Nebenwirkungen zeigen. Ein Beispiel hierfür ist Amikacin, ein semi-synthetisches Derivat des Kanamycins (Begg, E.J. & Barclay, M.L. Br. J. Clin. Pharmacol. 39, 597-603, 1995). Durch die Anwendung von Amikacin wurde die Toxizitätsrate auf 1-4% vermindert. Allerdings ist auch dieser Ansatz mit einer weiteren Erhöhung der Therapiekosten verbunden, da Amikacin (DM 180/Tag) deutlich teurer ist als herkömmliche Gentamicin-Präparate (DM 35/Tag). Moestrup und Kollegen konnten zeigen, daß Amikacin etwa 5 mal schlechter als Gentamicin an Megalin bindet (Moestrup et al., 1995). Die offensichtlich direkte Korrelation von Toxizität und bakteriziden Eigenschaften wird durch das Beispiel des Amikacins verdeutlicht. Diese Antibiotikum bindet zwar deutlich schlechter an Megalin (geringere Toxizität), muß aber in 10-fach höherer Dosierung als herkömmliche Aminoglykoside eingesetzt werden (geringe Bakterizidität).

[0007] Als dritten Ansatz zur Verminderung der Aminoglykosid-assoziierten Toxizität wurde die gleichzeitige Gabe der Antibiotika mit Substanzen wie Neutrophin-3 (Ernfors, P., Duan, M.L., ElShamy, W.M. & Canlon, B. Nat. Med. 2, 463-467 (1996)), Nitrendipin (Lee, S.M., Pattison, M.E. & Michael, U.F.J. Cardiovasc. Pharmacol. 9, S. 65-S69 (1987)), Pyrola rotundifolia (Xuan, W. & Dong, M. Ann. Otol. Rhinol. Laryngol. 104, 374-380 (1995)) oder Antioxidantien getestet (Schacht, J. Head and Neck Surgery 118, 674-677 (1998)). Die genauen Wirkmechanismen dieser Substanzen blieben ungeklärt. Keiner der Ansätze hat bisher Eingang in die Klinik gefunden.

[0008] Desweiteren zeigten Ford et al. auch noch, dass Aminoglykoside sowohl vom Kreislauf als auch vom Nierenfiltrat her in die Niere aufgenommen werden. Da Megalin nur zum Nierenfiltrat hin exponiert ist, geht die Fachwelt von der Existenz alternativer Rezeptoren aus (Ford et al., Am. J. Physiol. 266, C52-C57).

[0009] Die Aufgabe der Erfindung war es deshalb, Rezeptoren für Aminoglykoside und ggf. für andere schädigende Substanzen in den Organen Niere und Innenohr zu suchen und aufbauend auf diesen Ergebnissen, spezifische Antagonisten zu entwickeln, welche die Bindung von Aminoglyko-

BEST AVAILABLE COPY

siden und anderen Therapeutika an solche Rezeptoren verhindern, um Schädigungen dieser Organe zu meiden.

[0010] Die Erfindung beruht auf den eigenen überraschenden Erkenntnissen, dass bei der Prüfung verschiedener Modelle zur Aminoglykosid-Aufnahme in die Niere, entgegen früheren Hypothesen erstmals gezeigt werden konnte, dass ausschließlich megalinvermittelte Prozesse für die Anhäufung der Antibiotika in der Niere verantwortlich sind, d. h. nur Megalin ist für die Aufnahme von Aminoglykosiden in die Niere verantwortlich.

[0011] Bei Megalin handelt es sich um einen 600 kDa großen Endocytose-Rezeptor der low density lipoprotein (LDL)-Rezeptor Genfamilie. Megalin ist ein multifunktionaler Clearance-Rezeptor, welcher eine Vielzahl von Makromolekülen bindet und internalisiert.

[0012] Mit der Aufklärung des Mechanismus, der zur unerwünschten Aufnahme von Aminoglykosiden insbesondere in die Niere und das Innenohr führt, wurde erfindungsgemäß eine Klasse von Antagonisten identifiziert, welche die Aufnahme von Aminoglykosiden in die Organe reduziert und somit die Nebenwirkungen dieser Antibiotika unterdrückt. Von entscheidender Bedeutung ist dabei die Erkenntnis, dass insbesondere polybasische Substanzen, welche die gleiche Ladungsverteilung wie Aminoglykoside haben, wie z. B. Polymyxin, mit Aminoglykosiden um die Megalinbindung kompetieren und somit als Antagonisten wirken.

[0013] Die erfindungsgemäßen Mittel umfassen deshalb vorzugsweise sämtliche Substanzen, die Megalin Antagonisten darstellen und polybasische Strukturen besitzen. Diese polybasischen Gruppierungen binden an Megalin und hemmen die Bindung von Aminoglykosiden und verwandten Stoffen oder verdrängen diese vom Rezeptor. Bevorzugte Verbindungen im Sinne der Erfindung sind insbesondere struktur- oder funktionsverwandte Moleküle des polybasischen Polymyxins. Das bedeutet: Die einzusetzenden Mittel zur Prävention vor Organschäden, insbesondere der Niere und des Innenohres, die durch Aminoglykoside induziert werden, sind polybasisch, megalinbindend, aminoglykosidverdrängend und nicht nephrotoxisch.

[0014] In einer anderen Ausführungsvariante handelt es sich bei Substanzen, die Megalin Antagonisten darstellen, um Peptide/Proteine, die bevorzugt vom natürlich vorkommenden RAP (receptor-associated protein) abgeleitet sind und die die gleichen Eigenschaften besitzen. Insbesondere sind es minimale funktionelle Proteindomänen. Maximal weisen diese Peptide 104 Aminosäuren auf, vorzugsweise 20 bis 60 Aminosäuren. RAP (receptor-associated protein) ist ein zelluläres Protein, das ca. 300 Aminosäuren umfaßt und welches bekannt dafür ist, dass es an Megalin bindet und die Interaktion des Rezeptors mit Liganden unterdrückt (zellulärer Rezeptor-Antagonist) (Willnow et al. EMBO J. 15: 2632-2639, 1996). Es ist gelungen, minimale Domänen von RAP (Peptide) zu ermitteln, die die minimal funktionelle Domäne der Rezeptorbindung und -inhibition tragen und somit ebenfalls als Megalin Antagonisten fungieren. Eine bevorzugte Domäne ist die Aminosäureposition 219-323 des RAP (Ellgaard et al., Eur. J. Biochemistry 244, 5444-551 (1997)).

[0015] Eine Anwendung der Megalin Antagonisten, insbesondere der polybasischen Moleküle, führt zur deutlichen Verminderung toxischer Nebenwirkungen der eingesetzten Medikamente auf Aminoglykosidbasis, was zu einer größeren Therapiesicherheit und zu wesentlich erweiterten Anwendungsmöglichkeiten dieser Medikamente führt. Durch die Megalin-Antagonisten, welche die Bindung von Aminoglykosiden an Megalin verhindern, werden die schweren Nebenwirkungen dieser Antibiotika vermieden. Überschüs-

sige Aminoglykoside häufen sich nicht in den Organen an, sondern werden ausgeschieden. Neben Aminoglykosiden gibt es eine Reihe weiterer, strukturell verwandter Medikamente, welche ebenfalls in der Niere akkumulieren und nephrotoxisch wirken. Hierzu zählen Ifosfamide, Antiepileptika und Aprotinin. Für alle diese Substanzen, falls sie ebenfalls über Megalin aufgenommen werden, können die erfindungsgemäßen Antagonisten eingesetzt werden, so dass die Anwendung von Rezeptor-Antagonisten nicht auf Aminoglykosid-Therapien beschränkt bleibt, sondern breite klinische Anwendung finden wird.

[0016] Basis der Erfindung ist ein Mausmodell mit einem induzierten Megalin-Gendefekt (Knockout-Maus; Nykjaer, A. et al. 1999. Cell 96: 507-515.).

[0017] In diesen Tieren wurde der Beitrag von Megalin und anderen rezeptor-vermittelten oder rezeptor-unabhängigen Prozessen an der Aminoglykosid-Aufnahme in die Niere getestet. Überraschenderweise zeigte sich, dass Mäuse ohne Megalin keine Aufnahme von Aminoglykosiden in die Niere aufweisen und überschüssige Antibiotika im Urin ausscheiden (Abb. 1).

[0018] Es konnte erstmals dargestellt werden, dass es sich bei der Interaktion zwischen Megalin und den Aminoglykosiden um keine klassische Rezeptor-Liganden-Wechselwirkung handelt. Stattdessen reagieren die negativen Ladungen des Rezeptors unspezifisch mit hunderten von positiv geladenen Aminoglykosidmolekülen (Abb. 2).

[0019] Aufgrund dieser Erkenntnisse konnten die erfindungsgemäß effektiven Rezeptorantagonisten bereitgestellt werden, die eine ähnliche Ladungsverteilung wie Aminoglykoside aufweisen, also polybasisch sind.

[0020] Es wurden polybasische Substanzen (wie z. B. Polymyxin B) identifiziert, welche vergleichbare Interaktionen mit Megalin eingehen. In Abb. 2 ist dargestellt, dass sie zu einer deutlichen Inhibition der Aminoglykosid-Aufnahme in die Niere führen (Abb. 3).

Legende zu den Abbildungen

Abb. 1

Megalin ist für die Aufnahme von Aminoglykosiden in die Niere verantwortlich

[0021] Radioaktiv-markierte Aminoglykoside (Gentamycin) wurden in 26 normale (Wild type) und in 3 megalin-defiziente Mäuse (Knockout) injiziert. Nach 24 Stunden wurde die Ausscheidung der Aminoglykoside im Urin beziehungsweise ihre Anhäufung in der Niere bestimmt. In Wildtypen häufen sich etwa 10% der verabreichten Aminoglykoside in der Niere an, 40% wird über den Urin ausgeschieden. In Knockout-Mäusen kommt es auf Grund der Rezeptordefizienz zu keiner Anhäufung der Aminoglykoside in der Niere; 40% der Antibiotika werden über den Urin ausgeschieden.

Abb. 2

[0022] Gereinigtes Megalinprotein wurde auf einem BIAcore Chip immobilisiert und mit Puffer ohne Gentamycin (0 mM) oder mit 1 mM, 5 mM und 10 mM Gentamycin inkubiert. Aus der Interaktion der Aminoglykoside mit dem Rezeptor (gemessen in "Response Units") läßt sich das molare Verhältnis von Rezeptor und gebundenem Aminoglykosid ermitteln. Nach diesen Messungen binden etwa 100 Aminoglykosidmoleküle an ein Rezeptormolekül.

Abb. 3

Megalin-Antagonisten unterdrücken die Aufnahme von Aminoglykosiden in die Niere.

[0023] Zwei Gruppen von Wildtyp-Mäusen erhielten eine Injektion von radioaktivem Gentamycin. Einer Gruppe wurde zusätzlich Polymyxin B injiziert, eine Substanz, welche mit hoher Affinität an Megalin bindet und Gentamycin vom Rezeptor verdrängt. Durch Gabe von Polymyxin B wird die Aufnahme von Aminoglykosiden in die Niere um mehr als 60% reduziert.

Patentansprüche

1. Mittel zur Prävention von Organschäden, insbesondere der Niere und des Innenohres, die durch Aminoglykoside oder verwandten Stoffen induziert werden, umfassend sämtliche Substanzen, die Antagonisten des Rezeptors Megalin darstellen und die die Bindung von den Aminoglykosiden und verwandten Stoffen an Megalin hemmen oder welche diese vom Rezeptor verdrängen.
2. Mittel nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Substanzen eine polybasische Ladungsverteilung aufweisen.
3. Mittel nach Anspruch 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, dass die polybasischen Substanzen struktur- oder funktionsverwandte Moleküle des polybasischen Polymyxins sind.
4. Mittel nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Substanzen Peptide/Proteine darstellen, die vom natürlich vorkommenden RAP (receptorassociated protein) abgeleitet sind und die die gleichen Eigenschaften besitzen.
5. Mittel nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass diese Peptide minimale funktionelle Domänen darstellen, die maximal 104 Aminosäuren aufweisen, vorzugsweise 20 bis 60 Aminosäuren.
6. Verwendung von Substanzen, die Megalin Antagonisten darstellen und den Rezeptor blockieren, zur Prävention von Organschäden, die durch Substanzen erzeugt werden, die über Megalin binden können, wie z. B. Aminoglykoside.

Hierzu 3 Seite(n) Zeichnungen

- Leerseite -

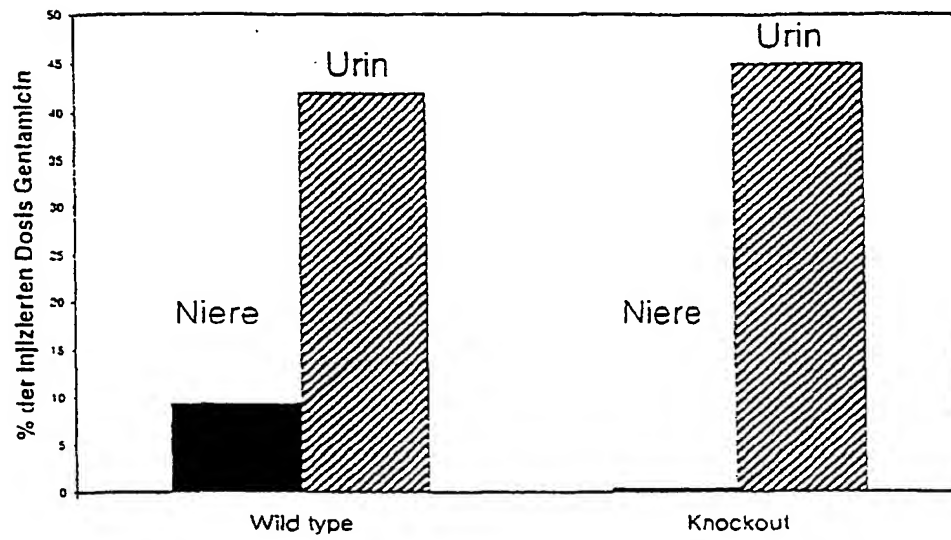


Abbildung 1:

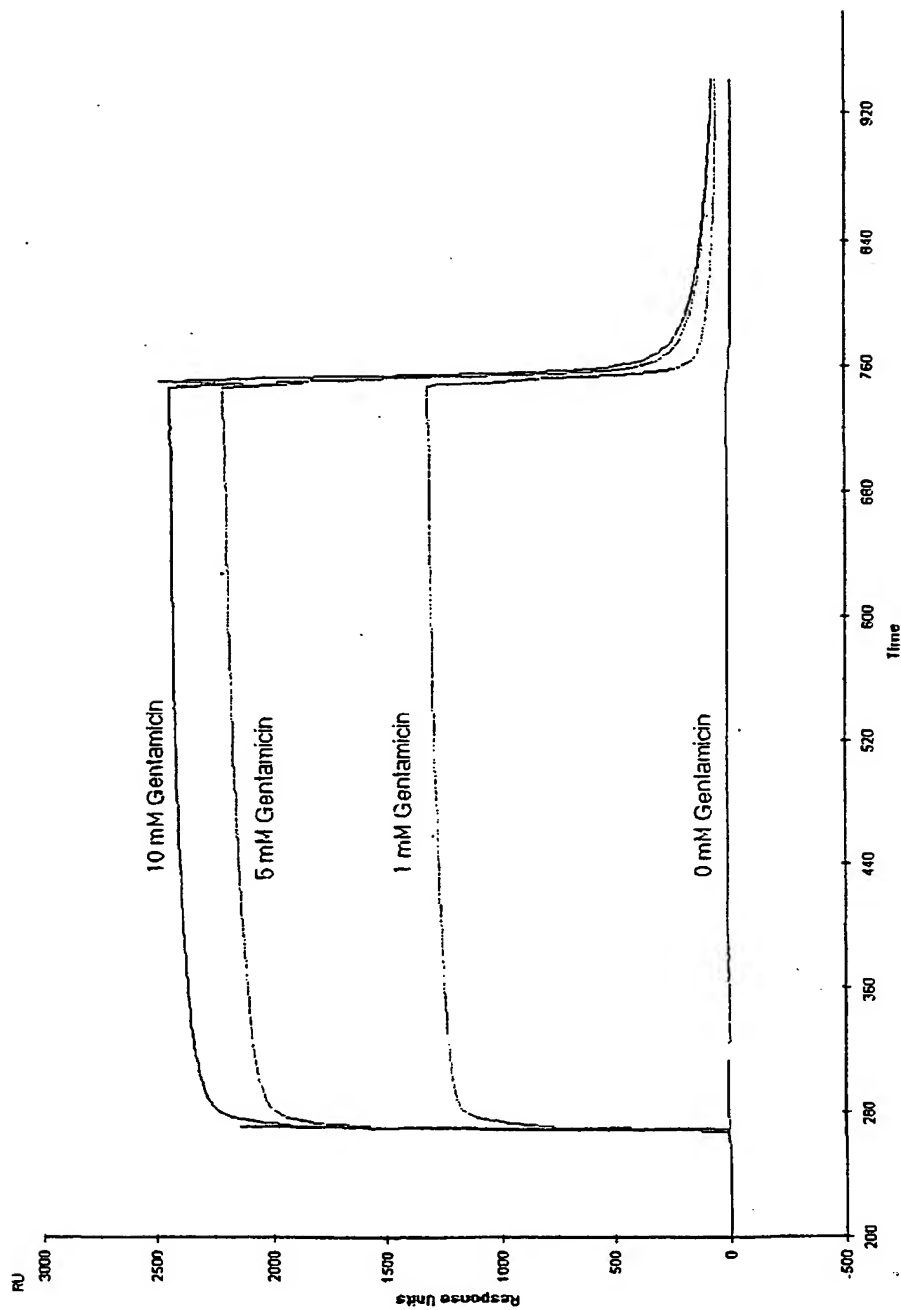


Abbildung 2:

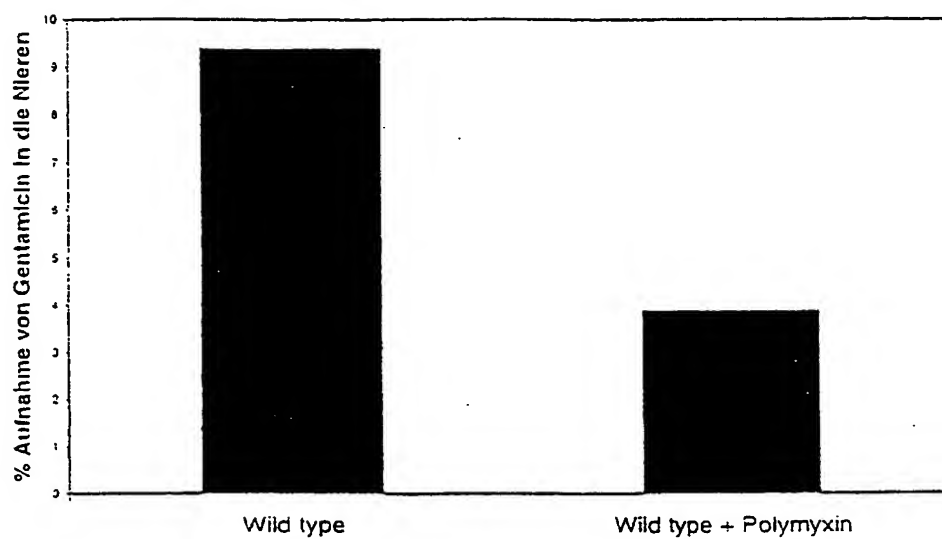


Abbildung 3: